

PCT National Publication Gazette

National Patent Publication No. 7-506258
Date of National Publication: July 13, 1995
International Class(es): C12M 1/00
1/34
C12Q 1/68
(15 pages in all)

Title of the Invention: Polynucleotide Amplification Analysis
Employing Microprocessing Device

Patent Appln. No. 5-519517
Filing Date: April 29, 1993
Date of Filing Translation: October 28, 1994
International Filing No. PCT/US93/04039
International Publication No. WO93/22058
International Publication Date: November 11, 1993

Priority Claimed: Country: U.S.A.
Filing Date: May 1, 1992
Serial Nos. 877,536 & 877,661
877,662 & 877,701
877,702

Inventor(s): Wilding, Peter
Clicca, Larry J.

Applicant(s): Trustees of the University of
Pennsylvania

(transliterated, therefore the
spelling might be incorrect)

(51) Int. Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 M 1/00	A	9050-4 B	
1/34	Z	7229-4 B	
C 1 2 Q 1/68	Z	9453-4 B	

審查請求 未請求 予備審查請求 有 (全 15 頁)

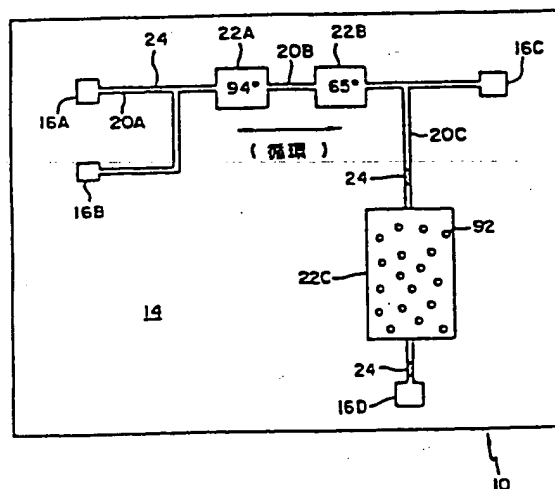
(21)出願番号	特願平5-519517	(71)出願人	トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア
(86)(22)出願日	平成5年(1993)4月29日		アメリカ合衆国19104ペンシルベニア州、
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)10月28日		フィラデルフィア、スイート300、マーケ
(86)国際出願番号	PCT/US93/04039		ット・ストリート3700番
(87)国際公開番号	WO93/22058	(72)発明者	ワイルディング、ピーター
(87)国際公開日	平成5年(1993)11月11日		アメリカ合衆国19301ペンシルベニア州、
(31)優先権主張番号	877,536		バオリ、ダービー・ロード208番
(32)優先日	1992年5月1日	(72)発明者	クリッカ、ラリー・ジェイ
(33)優先権主張国	米国(US)		アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州、
(31)優先権主張番号	877,661		パーウィン、ネイサン・ヘイル・ロード
(32)優先日	1992年5月1日		886番
(33)優先権主張国	米国(US)	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微細加工装置を用いたポリヌクレオチド増幅分析

(57)【要約】

ポリヌクレオチド重合反応を行うことにより試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための装置を開示する。該装置は、試料流入ポート(16A)および流入ポート(16A)より伸びるメソスケール流動システムを形成するよう微細加工された基材よりなる。該メソスケール流動システム(20)は、流入ポートと流体連絡したポリヌクレオチド重合反応チャンバー(22)を含有し、該チャンバーには予め選択されたポリヌクレオチドの重合および増幅に要する試薬が配されている。一の実施例において、該装置を利用して、該反応チャンバー(PCRチャンバー)中でポリメラーゼ鎖反応(PCR)を行うことができる。該PCRチャンバー(22)には、ポリメラーゼ鎖反応に要する試料ポリヌクレオチド、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、プライマーおよび他の試薬が配されており、該装置には、反応チャンバーの内容物の温度を、二本鎖ポリヌクレオチドを脱ハイブリダイズさせる温度、プライマーをアニーリングさせる温度、およびポリヌクレオチドを重合し増幅させる温度に熱コントロールするための手段が配されている。



請求の範囲

1. ポリヌクレオチド重合反応を行うことにより、試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための装置であって：

試料流入ポートと；

該流入ポートから伸びる試料流動チャンネル；および

該流動チャンネルと流体連絡し、重合反応用の試薬を含有するポリヌクレオチド重合反応チャンバー；よりなるメソスケール流動システム；とを形成するよう微細加工された固体基材；ならびに

該チャンバーの内容物を無調整し、温度をコントロールして該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための手段よりなる該装置。

2. 該重合反応がポリメラーゼ鎖反応(PCR)であって、該PCRチャンバーが：該予め選択されたポリヌクレオチド、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、該試料ポリヌクレオチドとハイブリダイズする第一のプライマー、および該ポリヌクレオチドに相補的な配列とハイブリダイズする第二のプライマーよりなり、該第一のプライマーおよび第二のプライマーが重合反応のポリヌクレオチド生成物の末端を形成し；および

無調整するための該手段が、二本鎖ポリヌクレオチドを一本鎖のポリヌクレオチドに分離し、該プライマーを一本鎖ポリヌクレオチドの相補領域にアニーリングするようコントロールされた温度と、該プライマーの間にポリヌクレオチドを合成するようコントロールされた温度との間に、該チャンバー中の内容物を、無調整して該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための手段よりなる請求項1記載の装置。

3. 該PCRチャンバーが：

二本鎖ポリヌクレオチドを分離する温度の第一のセクション；

該プライマーを一本鎖ポリヌクレオチドの相補領域にアニーリングする温度の第二のセクション；

パーと流体連絡した該基材中に配されたメソスケール流出口領域よりなり；および該装置が

さらに、該反応チャンバーを通しての、該増幅されたポリヌクレオチドを該流出口領域に輸送する流動を誘起させるための手段を含有する請求項10記載の装置。

13. 該流出口領域が、該増幅されたポリヌクレオチドに抽出可能に結合しうるポリヌクレオチド・ブローブを含有する請求項12記載の装置。

14. 該ポリヌクレオチド・ブローブが、弾性ビーズ上に固定化されている請求項13記載の装置。

15. 該流出口領域が、複数の第二の流動チャンネルに通じる分岐部よりなる、該流動チャンネルに流体連絡したフラクタル領域よりなる請求項14記載の装置。

16. 該試料が細胞試料であって、該装置が、さらに：

該メソスケール流動システム中の該反応チャンバーに流体連絡し、細胞試料を溶解するための細胞溶解手段；および

該細胞溶解手段、次いで、該反応チャンバーへの該試料の流動を誘起するための手段よりなる請求項1記載の装置。

17. さらに、：該細胞溶解手段から上流にあって、該細胞集団に結合しうる結合部位よりなる、予め選択された細胞集団を選択的に捕獲するための細胞分離領域；および

該分離領域内において：

最初は、該試料からの該細胞集団を分離するための該結合部位によって、該試料中の該細胞集団を捕獲するのに十分に遅い流速；次いで、

二番目に、該分離された細胞集団を該分離領域から該溶解領域へ放出させるのに十分に遅い流速にて流動を誘起するための手段よりなる請求項16記載の装置。

18. 該固体基材が、微細加工されたシリコンよりなる請求項1記載の装置。

19. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具よりなり、該器具が：

該基材を保持するための手段；および

該第一のセクションおよび第二のセクションの間に配された流路よりなり；

ここに、該装置が、

該チャンバーの内容物を、少なくとも該第一のセクションおよび第二のセクションの間に繰り返し輸送して、該ポリヌクレオチドの複数の増幅循環を行うための手段を含有する請求項2記載の装置。

4. 該第一のセクションが二本鎖ポリヌクレオチドを分離する温度にコントロールされ；かつ、

該第二のセクションおよび該流路が該第一のセクションから離れて位置し、それにより、該第一のセクションから該第二のセクションへの該チャンバーの内容物の輸送の間に、プライマーを一本鎖ポリヌクレオチドにアニーリングするのに十分な温度まで試料が受動的に冷却される請求項3記載の装置。

5. さらに、該第一のセクションおよび第二のセクションを別々に熱コントロールするための手段よりなる請求項3記載の装置。

6. さらに、該第一のセクションを熱コントロールするための手段よりなる請求項4記載の装置。

7. 該熱コントロールするための手段が、電気抵抗手段よりなる請求項5または6記載の装置。

8. 該熱コントロールするための手段が、該PCRチャンバーに電気エネルギーを供給するための手段よりなる請求項5または6記載の装置。

9. 該基材が、さらに、該PCRチャンパーと流体連絡する第二のポートよりなる請求項2記載の装置。

10. さらに、該増幅されたポリヌクレオチドを抽出するための手段よりなる請求項1記載の装置。

11. 該抽出するための手段が、ポリヌクレオチド凝集により引き起こされる該流路中の液体の流動に対する抵抗を抽出するための手段よりなる請求項10記載の装置。

12. 該増幅されたポリヌクレオチドを抽出するための該手段が、該反応チャン

該基材上の流入ポートと接合する流体流入手段よりなる請求項1記載の装置。

20. さらに、該保持手段に保持させた場合に、該基材の流動システムを通して流体を通過させるためのポンプ手段よりなる請求項19記載の装置。

21. 該器具が、さらに、試薬入れ、および、試薬を該流動システムにデリバリーするための手段よりなる請求項20記載の装置。

22. 該器具が、該反応チャンパーを加熱するための手段を含有する請求項19記載の装置。

23. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具よりなり、該器具が：

該基材を支持するための手段；および

該基材中の該メソスケール流動システムの内容物を観察するための光学的手段よりなる請求項10記載の装置。

24. 該光学的手段が拡大光学装置およびビデオカメラよりなり、該器具が、さらに：

該装置の角度および位置を手動的に調整するための材料機構；および

該流動システムの内容物を観察するためのビデオ・スクリーンよりなる請求項23記載の装置。

25. ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を行うことにより、試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための装置であって：

試料流入ポートと；

該流入ポートから伸びる試料流動チャンネル；および

該流動チャンネルに流体連絡し、該予め選択されたポリヌクレオチドおよびPCR試薬を受けるためのPCRチャンパーよりなるメソスケール流動システムとを形成するよう微細加工された固体基材；ならびに

該チャンパーの内容物を無調整させ、それにより、各々の循環において、温度をコントロールして二本鎖ポリヌクレオチドを分離させて、ポリヌクレオチドを合成し、それによって該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための手段

よりなる装置。

26. さらに、該流動システムが、該PCRチャンパーと流体連絡する排出チャンパーよりなる請求項25記載の装置。

27. 該PCRチャンパーが：

二本線ポリヌクレオチドを分離させる温度の第一のセクション；

一本線ポリヌクレオチドをアニーリングさせ、ポリヌクレオチドを重合し増幅させる温度の第二のセクション；

該第一のセクションおよび第二のセクションの間に配された流路；ならびに
該チャンパーの内容物を、該第一のセクションおよび第二のセクションの間に繰り返し輸送して該ポリヌクレオチドの複製の増幅段階を行うための手段よりなる請求項25記載の装置。

28. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具よりなり、該器具が：

該基材上の流入ポートに接合した流体流入手段よりなる、該基材を支持するための収容部よりなる請求項25記載の装置。

29. 基材に加工された電気接触部を含有する装置であって：

該収容部が、さらに、該基材中に該電気接触部と接合させるための電気コネクションを含有する請求項28記載の装置。

30. 該器具が、さらに、該保持手段に保持された場合に、該基材の該流動システムを通して流体を通過させるためのポンプ手段よりなる請求項28記載の装置。

31. 該流動システムが、さらに、該PCRチャンパーと流体連絡した排出領域よりなる請求項29記載の装置。

32. 該器具が、さらに、電源よりなる請求項28記載の装置。

33. ポリヌクレオチド重合反応を行うことによって試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための方法であって：

(1) 試料流入ポートと；

該流入ポートから伸びる試料流動チャンネル；および

該流動チャンネルと流体連絡したポリヌクレオチド重合反応チャン

パーの第一のセクションおよび第二のセクションの間に配された流路よりなり、

該装置が、さらに、該チャンパーの内容物を、該第一のセクションおよび該第二のセクションの間に繰り返し輸送するための手段を含有し；

工程(Ⅱ)が、該チャンパーの内容物を該第一のセクションおよび該第二のセクションの間に繰り返し輸送させてポリヌクレオチドの複製の増幅段階を行う工程を含有する；

ことを特徴とする請求項34記載の方法。

36. 該第一のセクションを二本線ポリヌクレオチドを分離する温度にコントロールし；および

該チャンパーの内容物の該第一のセクションから該第二セクションへの輸送に際し、該試料がアニーリングし重合する温度まで実質的に冷却されるように、該第二のセクションおよび該流路を該第一のセクションから離れて位置させ；ならびに

工程(Ⅲ)が、該チャンパーの内容物を該第一のセクションおよび該第二のセクションの間に繰り返し輸送させて該ポリヌクレオチドを重合させる工程を包含する請求項35記載の方法。

37. 該装置が、さらに、増幅させたポリヌクレオチドを排出するための手段を包含し、さらに、

(ⅳ)該増幅させたポリヌクレオチドを排出すること

よりなる請求項33記載の方法。

38. 該排出手段が、ポリヌクレオチド凝集により引き起こされる該チャンパー内の流体の流動の抵抗を排出するための手段よりなり；および

工程(ⅳ)が、流動に対する抵抗を該排出手段で排出する工程を包含する請求項37記載の方法。

39. 該増幅させたポリヌクレオチドを排出するための該手段が、該基材の中に該反応チャンパーと流体連絡して配されたメソスケール排出領域よりなり；および

パーよりなるメソスケール流動システムとを形成するように微細加工された固体基材；ならびに

該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるために、該チャンパーの内容物をコントロールされた温度に熱調整するための手段；

よりなる装置を供し、

(ⅱ)該試料ポリヌクレオチドおよび重合反応に要する試薬を、該流入ポートおよび該メソスケール流動システムを通してデリバリーし、次いで、

(ⅲ)該チャンパーの内容物を熱コントロールして該ポリヌクレオチドを重合させる

ことを特徴とする該方法。

34. 該重合反応がポヌラーゼ反応(PCR)であって：

工程(ⅰ)で、該熱コントロールするための該手段が、該チャンパーの内容物を熱調整するための手段よりなり；

工程(ⅱ)が、：ポヌラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、該試料ポリヌクレオチドとハイブリダイズする第一のプライマー、および該ポリヌクレオチドに相補的な配列とハイブリダイズする第二のプライマーを該PCRチャンパーに添加する工程を含有し、ここで、該第一のプライマーおよび第二のプライマーは重合反応のポリヌクレオチド生成物の末端を形成し；および

工程(ⅲ)が、該チャンパーの内容物を熱調整させる工程を含有し、それにより、各々の段階において、温度をコントロールして、二本線ポリヌクレオチドを分離し、それにより、することにより一本線ポリヌクレオチドを生成させ、一本線ポリヌクレオチドの相補領域にアニーリングさせて該プライマーの間にポリヌクレオチドを合成し重合させる請求項33記載の方法。

35. 該PCRチャンパーが：

二本線ポリヌクレオチドを分離する温度の第一のセクション；

一本線ポリヌクレオチドの相補領域をアニーリングさせ、ポリヌクレオチドを重合させ増幅させる温度の第二のセクション；

該装置が、さらに、該反応チャンパーを通る流動を誘起して、該増幅させたポリヌクレオチドを該排出領域へ輸送するための手段を含有し；ならびに

工程(ⅳ)が、該試料を該反応チャンパーから該排出領域へ該輸送手段でデリバリーし、次いで、該増幅させたポリヌクレオチドを該排出領域中で排出する工程を包含する請求項37記載の方法。

40. 該排出領域が、該試料ポリヌクレオチドに排出可能に結合できるポリヌクレオチド・プローブを包含し；および

ここで、工程(ⅳ)において、該試料ポリヌクレオチドの該プローブへの結合を排出する請求項39記載の方法。

41. 該排出領域が、該流動チャンネルと流体連絡した、複製の第二の流動チャンネルに通ずる分岐部よりなるフラクタル流動領域よりなり；および

ここで、工程(ⅳ)において、該フラクタル流動領域を通しての試料流体の流動を排出する請求項39記載の方法。

42. 該試料が細胞試料であって、該装置が、さらに：

該試料が反応チャンパーにデリバリーされる前に細胞試料を溶解させるための、該反応チャンパーと流体連絡した該メソスケール流動システム中の細胞溶解手段；および

該細胞溶解手段を通しての該反応チャンパーへの該試料の流動を誘起させるための手段よりなり；ならびに

工程(ⅲ)が、該試料を該溶解手段へ、次いで、該反応チャンパーへとデリバリーする工程を包含する請求項33記載の方法。

43. 該装置が、さらに：

予め選択された細胞集団を選択的に検出するための、該細胞溶解手段の隣にあって、該細胞集団へ結合できる結合部位よりなる細胞分離領域よりなり；および
工程(ⅲ)が、該細胞試料を該細胞溶解手段へデリバリーする前に

第一に、該試料中の該細胞集団が、該結合部位によって検出されて該試料から該細胞集団を分離するのに十分な遅い流速；次いで、

第二に、該分離された細胞集団を、該領域から該細胞溶解手段へ放出させるのに十分に高濃度で、
該試料を該細胞分離領域にデリバリーする工程を包含する請求項4記載の方法。

関連出願の相互参照

本出願は以下の関連する同時係属出願: 1992年5月1日出願のUSSN 07/877,702; 1992年5月1日出願のUSSN 07/877,701; 1992年5月1日出願のUSSN 07/877,536; および1992年5月1日出願のU.S.シリアルナンバー 07/877,661と同時に出版されており、これらの開示を引用して本明細書の一部となす。

発明の背景

本発明は、一般的に、分析を行うための方法と装置に関する。より具体的には、本発明はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む分析が可能な小さく、典型的には単一使用法のモジュールのデザインと構成に関する。

ここ何十年かの間に、種々の診断および監視の目的のための生物学的試料の分析を行うための非常に多数のプロトコル、試験キット、およびカートリッジが当該技術により開発されてきた。イムノアッセイ、凝集アッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応に基づく分析、種々のリガンド-レセプター相互作用、そして種々な試料中の種の分別移動が全て種々の生物学的化合物もしくは汚染物の存在または濃度、または特定の細胞のタイプの存在を決定するために用いられてきた。

最近、生物学的試料を取り扱うため、またある種の臨床テストを行うために小さく使い捨ての装置が開発されてきた。ショウジ(Shoji)らは、シリコンウェハーの上に加工された小型の血液のガスアナライザーの使用を報告している。ショウジ(Shoji)らの、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators)、第15巻: 第101頁〜第107頁(1988年)、サトウ(Sato)らは、微小機械加工法によるシリコン装置を用いた細胞融合技術を報告している。サトウ(Sato)らの、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators)、A21-A23: 第948頁〜第953頁(1990年)。チバ・コーニング・ダイアグノスティクス・コーポレーション(Ciba Corning

Diagnostics Corp.) USAは血液凝固を感知するマイクロプロセッサで制御されたレーザー光区計を製造した。

微小機械工学はマイクロ電子工学から起こった。アングル(Angell)ら、サイエントフィック・アメリカン(Scientific American)、第248巻: 第44頁〜第55頁(1983年)。微小機械工学により、最小寸法を何十ミクロン(生物の細胞の寸法)からナノメートル(いくつかの生物学的高分子の寸法)まで変化させる構成要素を有する微小工学装置の製造が可能となった。このスケールは本明細書中において「メソスケール」と呼ばれる。メソスケールの構造を伴う大部分の実験は微小機械の研究、すなわち、機械の運動および流れの特性の研究を伴う。メソスケールの構造の潜在的な能力は生命化学において十分には開発されてきていない。

ブルーネット(Brunette)(エキスペリメンタル・セル・リサーチ(Exper. Cell Res.)), 第167巻: 203頁〜217頁(1986年)および第164巻: 第111頁〜第26頁(1986年))は、シリコン、テタラニウムポリマー等の膜中における細胞膜細胞および上皮細胞の行動を研究した。マッカーニー(McCartney)ら(キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)), 第41巻: 第3046頁〜第3051頁、1981年))は、液を配ったプラスチックの基材中の腫瘍細胞の行動を拡張した。ラセル(LaCelle)(ブラッド・セルズ(Blood Cells)), 第12巻: 第179頁〜第189頁(1986年))は、微小循環を観察するためにマイクロキャピラリー中における白血球と赤血球の流れを研究した。フング(Hung)とワイスマン(Weissman)は微小機械加工したチャンネルの流体動力学的研究を報告したが、分析装置に関連するデータは作成していない。フング(Hung)ら、(メディカル・アンド・バイオリジカル・エンジニアリング(Med. and Biol. Engineering)), 第9巻: 第237頁〜第245頁(1971年); およびワイスマン(Weissman)ら、(アム・インスト・ケム・イング・ジャーナル(Am. Inst. Chem. Eng. J.)), 第17巻: 第25頁〜第30頁(1971年))。コロンブス(Columbus)らは、実験上のマルチチャンネル試験装置においてイオン選択的電極を分離するために、生物学的液の毛管流の制御において、2枚の垂直に配置されV型溝にエンボス加工した

シートからなるサンドイッチを利用した。コロンブス(Columbus)ら(クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)), 第33巻: 第1531頁〜第1537頁(1987年))。ナスダ(Nasuda)らおよびワシズ(Washizu)らは細胞の操作(例えば細胞融合)のための流体流動チャンベラの使用について報告している。ナスダ(Nasuda)ら、プロシーディングス・アイイーイーイー/アイエーエス・ミーティング(Proceedings IEEE/IAS Meeting), 第1549頁〜第1553頁(1987年); およびワシズ(Washizu)ら、プロシーディングス・アイイーイーイー/アイエーエス・ミーティング(Proceedings IEEE/IAS Meeting), 第1735頁〜第1740頁(1988年)。本技術は生物学的液の分析のためのメソスケールの装置の使用の潜在力を十分に探求していない。

DNA断片を増幅させるためポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる方法論は十分に確立されている(例えば、マニアティス(Manatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning): ア・ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989年、頁14.1〜14.35参照)。PCR増幅反応は耐熱性DNAポリメラーゼ、例えば、タック(Taq) DNAポリメラーゼ(チエン(Chien)ら、シ・ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.)), 第127巻: 第1550頁(1976年))と、ヌクレオシド三リン酸、そして特異的DNAと相対している二本の鎖に存在する配列とそれぞれ相補的であり、増幅されるべきDNA断片に隣接する、異なる配列を有する2個のオリゴヌクレオチド(「プライマー」)を用い特異的DNA上でなされる。反応成分は二本の特異的DNAのハイブリッドを増幅(「増殖する」)ための高い方の温度(例えば94℃)に続いてアニールし重合するための低い方の温度(例えば65℃)の間を循環する。ハイブリッド増殖、アニール及び重合の間の連続的な反応サイクルにより特異的DNAの指数関数的増幅が供給される。例えば、長さが2 kbまでで1 μgまでの特異的DNAは出発時のDNAのわずか10⁻⁶ μgから30から35サイクルの増幅により得られる。サーマル・サイクラーを用い、自動化されたPCR増幅を行うための機械が入手可能である(パーキン・エルマー・コー

ボレイション(Perkin Elmer Corp.))。

PCR増幅は遺伝的な病気の診断に応用されてきた(エンゲルケ(Engelke)ら、*プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス*(Proc. Natl. Acad. Sci.), 第85巻:第544頁(1988年)、臨床試料の病原生物の検出配列の検出、(オウ(Ou)ら、*サイエンス*(Science), 第239巻:第295頁(1988年))、臨床試料、例えば精子の遺伝的同一性(リー(Li)ら、*ネイチャー*(Nature), 第335巻:第414頁(1988年)、活性化された遺伝子における変異の分析(ファー(Farr)ら、*プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス*(Proc. Natl. Acad. Sci.), 第85巻:第1629頁(1988年))および分子クローニングの多くの態様において(オステ(Oste), *バイオテクノロジー*(BioTechniques), 第6巻:第162頁(1988年))。PCRによる分析は、プローブとしての使用のためのクローン化した二本鎖DNAの特定の配列を生成するため、cDNAの特定の断片を選択的に増幅させることにより、クローン化されていない遺伝子に特定のプローブを生成するため、少量のmRNAからcDNAのライブラリーを調製するため、塩基配列決定のための大量の試料の調製のため、変異の分析のため、の様に広い応用範囲で用いることができる。父系と、遺伝的または伝染性の病気の試験のごとき試験で広範囲の潜在的適用において臨床的に用いることのできる、PCR分析のための簡便で迅速なシステムが必要とされている。

本発明の一つの目的は、最少量の試料を分析でき、非常に低い濃度のポリヌクレオチドを検出でき、分析結果を迅速に出せるような最適な反応環境を伴う分析システムを提供することにある。もう一つの目的は、一連の応用において簡便して選択した細胞または無細胞試料の、迅速で自動化されたPCR分析用試料が行えるメソスケールの機能要素を備えた、容易に大量生産できる、便携性の小さな(例えば体積にして1cc以下)装置を提供することにある。本発明のさらなる目的は、迅速な臨床試験、例えばウイルスまたは細菌による感染の試験、細胞培養の汚染物の試験、もしくは細胞中の超換えDNAまたは遺伝子の存在の試験等の一連の迅速な臨床試験を実施するために簡便に使用できるような一連の装置

レオチドを合成するようにPCRチャンバーの内容物の温度を自動的に変化させるための手段をも含む。一つの具体例において、PCRチャンバーは、PCRのために必要な温度に連続的に温度が変化するような一連のセクションからなるものとして構成される。別法として、PCRチャンバーは、ハイブリッド期、アニーリングおよび重合のために必要とされる異なる温度に設定された二個もしくはそれ以上のセクションからなり、この場合、本装置はさらに、例えば、本明細書中で開示することく、PCRを実施するためにセクション間にチャンバーの内容物を循環させる手段、例えば、ポンプその他の手段を含む。本装置は、さらに、増幅したポリヌクレオチドを検出する手段をも含む。本装置は、マーカーとしてのある特定のポリヌクレオチドの存在を用いた、細胞中または溶液中のポリヌクレオチドの存在の分析、あるいはウイルスまたは細胞のタイプの分析を含めた、種々の自動化された、感度が良好な迅速なポリヌクレオチドの分析を実施するために使用することができる。

一般的に、本明細書中で開示することく、固体基材はメソスケールのフロー・システムと反応チャンバーを含むチップからなる。メソスケールのフロー・システムと反応チャンバーは種立された微小機械加工方法を用いシリコンおよび他の固体基材からデザインされ加工される。装置中のメソスケールのフロー・システムはフロー・チャンネルと一層またはそれ以上の反応チャンバーを基材の表面に形成加工し、次いでカバー、例えば透明なガラスのカバーを表面上に付着させることにより組み立てることができる。本装置は、例えば、基材またはカバーを貫いて連結する孔によって形成される注入ポートを通してフロー・システムに導入される最少体積(<10 μ L)の試料を分析する。メソスケールのフロー・システムの体積は、典型的には、5 μ Lより小さいであろうし、個々のチャンネル、チャンバー、または他の機能要素の体積は、しばしば、1 μ Lより小さく、例えばナノリッターもしくはピコリッターの範囲であることさえある。非常に低い濃度で存在するポリヌクレオチド(たとえばナノグラム量)が迅速に(<10分)増幅され検出される。ポリヌクレオチドの重合反応が完了した後、装置を捨てることができる。

を提供することにある。

発明の要約

本発明は試料中のポリヌクレオチドの迅速な増幅を可能にするポリヌクレオチド重合反応を行うための小さく、大量生産できる、典型的には単一使用の一連の装置を提供する。一つの具体例において、本装置は、数ミリメートルの厚さで約0.2ないし2.0センチメートル平方の大きさであって、試料の注入ポートとメソスケールのフロー・システムを形成するように形成加工された固体基材よりなる。本装置のフロー・システムは、注入ポートから伸びる試料のフロー・チャンネル、およびフロー・チャンネルのポリヌクレオチドと液体連絡したポリヌクレオチド重合反応チャンバーを含む。"メソスケール"という用語は本明細書中において横断面の寸法が0.1 μ mないし500 μ mであって、好ましい反応チャンバーの幅が2.0ないし500 μ mであり、より好ましくは3ないし100 μ mであるようなチャンネルと流路を定義するのに用いる。多くの適用において、5ないし50 μ mの幅のチャンネルが有用であろう。増幅が起こる基材中のチャンネルは多少それより大きい寸法、例えば1ないし5mmにすることができる。好ましい反応チャンバーおよびチャンネルの深さは0.1ないし100 μ m、典型的には2ないし50 μ mである。本装置のフロー・チャンネルは、反応チャンバーに通じており、好ましい幅は2.0ないし200 μ mであり、深さは0.1ないし100 μ mである。

一つの具体例において、本装置は反応チャンバー中でポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施するために利用することができる。反応チャンバーには、試料のポリヌクレオチド、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、試料のポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能な一層目のプライマー、試料のポリヌクレオチドに相補的な配列とハイブリダイズ可能な二層目のプライマー(ここに一層目と二層目のプライマーは重合するポリヌクレオチド生成物の両末端を定義する)を含むPCRのための試薬を提供することができる。本装置は、各サイクルにおいて、温度を制御して1)二本鎖ハイブリッドを増す(融解する)、2)プライマーを一本鎖DNAにアニールさせる、および3)プライマーの間で増幅されたポリヌク

レオチドを合成するようにPCRチャンバーの内容物の温度を自動的に変化させるための手段をも含む。一つの具体例において、PCRチャンバーは、PCRのために必要な温度に連続的に温度が変化するような一連のセクションからなるものとして構成される。別法として、PCRチャンバーは、ハイブリッド期、アニーリングおよび重合のために必要とされる異なる温度に設定された二個もしくはそれ以上のセクションからなり、この場合、本装置はさらに、例えば、本明細書中で開示することく、PCRを実施するためにセクション間にチャンバーの内容物を循環させる手段、例えば、ポンプその他の手段を含む。本装置は、さらに、増幅したポリヌクレオチドを検出する手段をも含む。本装置は、マーカーとしてのある特定のポリヌクレオチドの存在を用いた、細胞中または溶液中のポリヌクレオチドの存在の分析、あるいはウイルスまたは細胞のタイプの分析を含めた、種々の自動化された、感度が良好な迅速なポリヌクレオチドの分析を実施するために使用することができる。

一般的に、本明細書中で開示することく、固体基材はメソスケールのフロー・システムと反応チャンバーを含むチップからなる。メソスケールのフロー・システムと反応チャンバーは種立された微小機械加工方法を用いシリコンおよび他の固体基材からデザインされ加工される。装置中のメソスケールのフロー・システムはフロー・チャンネルと一層またはそれ以上の反応チャンバーを基材の表面に形成加工し、次いでカバー、例えば透明なガラスのカバーを表面上に付着させることにより組み立てることができる。本装置は、例えば、基材またはカバーを貫いて連結する孔によって形成される注入ポートを通してフロー・システムに導入される最少体積(<10 μ L)の試料を分析する。メソスケールのフロー・システムの体積は、典型的には、5 μ Lより小さいであろうし、個々のチャンネル、チャンバー、または他の機能要素の体積は、しばしば、1 μ Lより小さく、例えばナノリッターもしくはピコリッターの範囲であることさえある。非常に低い濃度で存在するポリヌクレオチド(たとえばナノグラム量)が迅速に(<10分)増幅され検出される。ポリヌクレオチドの重合反応が完了した後、装置を捨てることができる。

メソスケールの反応チャンバー中のポリヌクレオチド増幅反応により生成した増幅ポリヌクレオチドは基材中のポートを通じて収集することができ、例えば、ゲル電気泳動その他の方法により検出される。別法として、装置中の反応チャンバーと液体連絡したメソスケールの検出領域を、メソスケールのフロー・システムの一部として、基材中に形成加工できる。該検出領域は、増幅したポリヌクレオチドと検出可能に結合できる、ラベルされたポリヌクレオチドあるいは抗体ブ

ローブのごときラベルされた結合部分を包含することができる。重合したポリヌクレオチド生成物の検出領域における存在は、例えば、重合したポリヌクレオチドと結合部位との距離、検出領域の上のカラスのカバーを通して、あるいは基材自体の半透明なセクションを通して光学的検出によって検出できる。

陽性の分析は、反応チャンバー中での重合したポリヌクレオチドの生産の際のフロー・システムの異なる地点における圧力または電気伝導度の変化のごとき試料液体の流れの特性における検出可能な変化によっても示唆できる。一つの具体例において、本装置はポリヌクレオチド増幅反応チャンバーを備えたメソスケールのフロー・システムがなり、検出領域は、例えば、当該検出領域の上面に設けた光学的窓を通して陽性の結果を採取するような分光光度計のごとき感知装置を備えた器具と組み合わせて用いることができる。本器具は反応チャンバー、検出領域、もしくはフロー・システムのどこかの領域で感知される圧力の表示、導電度等を示す電気的信号を受け取るように設計することができる。

本基材は混合物中のポリヌクレオチドの迅速な平行した検出を可能にする複数の検出/反応チャンバーからなるものとする。本メソスケールのフロー・システムは、微量試料中の細胞の溶解を反応チャンバーに運ばれる前に可能にするための突出部分、あるいは減少した断面積のセクションを含む。流路の中に入れられたシリコンの鋭い角を持つ断片もまた溶解の手段として用いることができる。メソスケールのフロー・システムにはまた例えば、フロー・チャンネルの壁に固定化され、細胞が、細胞を溶解する領域に、次いで反応チャンバーに運ばれる前に、液体の流れの低い速度においては不均一な細胞の集団の中のある特定のタイプの細胞を結合し、液体の流れの高い速度においては、そのタイプの細胞を放出するような結合部位からなる細胞捕獲領域を含めることができる。この具体例において、選択された細胞の細胞集団から細胞内DNAまたはRNAは単離され、一個の装置内でのポリヌクレオチド分析のためにメソスケールの反応チャンバーに運ばれる。

もう一つの具体例において、粘性ビーズがメソスケールのフロー・システムに設けられ、これは、例えば、器具中の外部磁場によりフロー・システムによって

動くことができる。一つの具体例において、ポリヌクレオチドのプロープが粘性ビーズに固定化され、このことによりビーズが反応チャンバー中の増幅したポリヌクレオチドに結合することができる。固定化されたポリヌクレオチドのプロープを含む粘性ビーズは、例えば、重合化されたポリヌクレオチド生成物を結合するために、分析の終わりに、フロー・システムを通し反応チャンバーに送られるであろう。結合したポリヌクレオチドは、次いで、フロー・システム中の検出あるいは検出チャンバー、もしくは収集ポートに、粘性ビーズののせて送ることができる。

本装置の幾つかの利点と特徴を表1に示す。本装置は病原体である細菌またはウイルスの検出のため、もしくはある細胞のタイプの存在、もしくは細胞における遺伝子または組換えDNAの配列の存在のための迅速な試験を供給する。本明細書中に開示される装置は全て、試料中のポリヌクレオチドを増幅するために用いられるPCRチャンバーを含むメソスケールのフロー・システムにより特徴付けられ、これにはPCRのために必要とされるポリメラーゼおよび他の試薬が供給される。本装置は広範囲の適用でポリヌクレオチドを増幅するのに使用できる。分析の終わりに、チップを一時的に捨てて。

表1

特性	利点
適応性	チップのデザインの数あるいは利用できる応用の数には制限なし。
再生性	チップの戻りでき、標準化された大量生産が可能。
低コストの生産	目下のシステムとの統合する評価が可能で、単一使用の工程における使い捨て可能な性質。
小さいサイズ	大規模な施設利用を要せず、不便な実験室の環境での使用のために設計された、持ち運び可能なユニットに適合し、保存および輸送コストが最小限。
メソスケール	必要な試料と試薬の体積が最小限で、試薬のコスト、特に高価で、特別な試験方法のための試薬のコストが低減化され、簡便化された器具利用の計画が可能。
滅菌性	クリーンな環境を必要とする微生物学的分析および他の手法で用いるためにチップは滅菌可能。
密封されたシステム	バイオハザードは最小限化され、工程の完全さは確実。
複数の回路が可能であること	一個のチップで多くの工程あるいは分析が実施可能で、パネル分析が可能。
検出器の複数の能力	事実上ほとんどのシステムに分析あるいは工程の監視の能力を拡大でき、広範囲の応用が可能。
再利用可能なチップ	ある種の適用のためには工程あたりのコストが使用者にとって低減化可能。

図面の簡単な説明

図1は、基材の表面に付着した透明なカバー12を有し、その上には注入ポート16とPCR反応チャンバー22に連絡されたメソスケールのフロー・チャンネル20が形成された本発明の装置の模式的縦断面図である。

図2は、図1の装置の斜視図である。

図3Aは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバー22の温度を制御するための加熱要素57を含む、模式的に示した器具50内に収容された分析装置10の模式的図である。

図3Bは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバー22の温度を制御するための加熱要素53を含む、器具50内に収容された分析装置10の模式的図である。

図4は、基材の表面に付着した透明なカバー12を有し、その上には注入ポート16とPCR反応チャンバーセクション22に連絡されたメソスケールのフロー・チャンネル20が形成された本発明の装置の模式的縦断面図である。

図5は、図4の装置の斜視図である。

図6Aは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバーセクション22の温度を制御するための加熱要素57を含む、器具50内に収容された分析装置10の模式的図である。

図6Bは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバーセクション22Aの温度を制御するための加熱要素57を含む、器具50内に収容された分析装置10の模式的図である。

図7は、基材上に対称的に設けられた、フロー・チャンネルのフラクタル分岐システム40からなる検出チャンバーと液体連絡したメソスケールのPCRチャンバーセクション22Aと22Bを備えた当該基材14の模式的平面図である。

図8は、チャンネルの壁から延びた、細胞または断片を通過する突出物80を備えた基材14中のフロー・チャンネル20の断面斜視図である。

図9は、チャンネルの壁から延びた、細胞を突き通す突出物90を備えた基材

14中のフロー・チャンネル20の断面斜視図である。

図10は、シリコン基材14中に微細加工したPCRチャンパーセクション22Aと22Bを含むメソスケールのPCR分析装置の模式的平面図である。

図11は、シリコン基材14中に微細加工したPCRチャンパー22Aを含むもう一つのメソスケールのPCR分析装置の模式的平面図である。

図12は、細胞の分別、細胞の溶解およびPCR分析を含む種々の機能を実施するのに適した一連のメソスケールのチャンパーを加工した分析装置の模式的平面図である。

図13はフラクタル分岐フロー・チャンネル40の一对を加工した分析装置の模式的平面図である。

図14、15および16は分析装置10中のフロー・チャンネル20中に微細加工したメソスケールのフィルター24の異なる具体例の計画の頂面図を示す。

図17は、装置10の内容物をろすために装置10と組み合わせる用いられる装置60の模式的斜視図である。

図18は、図17の装置60の模式的断面図である。

各図面中の同様の参照符号は対応する部分を示す。

詳細な記述

本発明は、液体試料中のポリヌクレオチドの迅速な増幅を可能にするポリヌクレオチド重合反応を実施するための小さく、大量生産できる、典型的には一回使用の一連の装置を提供する。本装置は、数ミリメートルの厚さで約0.2ないし2.0センチメートル平方のような大きさを有して、試料の注入ポートとメソスケールのフロー・システムを形成するように微細加工された基材よりなる。メソスケールのフロー・システムは、注入ポートから伸びる少なくとも一つの試料フロー・チャンネル、およびフロー・チャンネルと液体連絡した少なくとも一つのポリヌクレオチド重合反応チャンパーを含む。チャンネル、チャンパー、および複数のポートを配置することにより、試料および試薬の連続的、逐次、かつ容積が正確な装置内への添加を容易とする。反応チャンパーおよびフロー・チャンネルは、好ましくは、メソスケールの寸法、即ち、断面の寸法が0.1μmな

の分析を含めた、種々の自動化された、高度良好で迅速なポリヌクレオチドの分析を実施するために使用することができる。分析の終わりには、装置を一般的には捨て、使用後の装置の使用により、試料間のコンタミネーションが排除される。試料および反応混合物は常に露ったままに維持でき、小容量により廃棄物の処理が単純化される。

メソスケールのフロー・チャンネルおよび反応チャンパーを持つ分析装置は、固体基材から設計することができ、大量に加工できる。これらは容易に製造できる。シリコンは、よく発達した技術によりその正確で能率的な加工が可能であるので好ましいが、ポリテトラフルオロエチレンを含むポリマーのごとき他の材料も使用できる。試料の注入その他のポート、試料のフロー・チャンネル、反応チャンパー、もしくは他の機能要素を含むメソスケールのフロー・システムは、かくして、当業者が公知の種々の微小機械加工方法のいずれによっても大量に、費用をかけてシリコン基材から加工できる。使用可能な微小機械加工の方法はスピンコーティングおよび化学蒸着、レーザー加工、またはUVまたは、X線のプロセスのごとき写真平版技術、あるいは、湿式化学プロセスもしくはプラズマプロセスのいずれかによりなされるエッチングの方法といったフィルム析出方法を含む。(例えば、マンツ(Mantz)ら、トレンズ・イン・アナリティカル・ケミストリー(Trends in Analytical Chemistry)、第10巻：第144頁〜第149頁(1991年)参照)。

酸化する層と深さのフロー・チャンネルはメソスケールの寸法で加工できる。加工されたメソスケールのフロー・チャンネルを含むシリコン基材はアノードに結合された薄いガラスのカバーで覆い、密封することができる。他の透明な、あるいは不透明なカバー材質も使用できる。別法として、二層のシリコン基材をサンドイッチとし、または一層のシリコン基材を2枚のガラスカバーの中にはさみこむことができる。透明なカバーを用いることにより、メソスケールのフロー・システム中の内容物を動的に眺めることが容易になる。他の加工へのアプローチも用いることができる。

一つの具体例において、PCR分析が本装置の反応チャンパー中で実施でき

いし500μmである。反応チャンパーの好ましい深さは0.7ないし100μmであり、好ましい幅は2.0ないし500μmである。好ましいフロー・チャンネルの深さは0.1ないし100μm、好ましい幅は2.0ないし200μmである。

一つの具体例において、本装置は反応チャンパー(PCRチャンパー)中でポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施するために利用することができる。PCRチャンパーには、試料ポリヌクレオチド、タック(Taq)ポリメラーゼのごときポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、試料ポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能な一基目のプライマー、ポリヌクレオチドに相補的な配列とハイブリダイズ可能な二基目のプライマー(ここに一基目と二基目のプライマーは重合する生成物ポリヌクレオチドの両末端を定義する)を含むポリメラーゼ連鎖反応に必要なPCR用試薬を供給することができる。ポリメラーゼ連鎖反応は、当該分野で確立された方法(マニアティス(Maniatis)ら、モレキュラー・クロニング(Molecular Cloning):ア・ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年)により実施できる。本装置には、各サイクルにおいて、温度を制御して二本鎖ポリヌクレオチドを脱ハイブリダイズさせて、一本鎖ポリヌクレオチドを得、次いで、プライマーをアニールし、ポリヌクレオチドの重合を促すようにチャンパーの内容物の温度を段階的に変化させるための手段を包含させることができる。それに加え、制御酵素/DNAポリメラーゼシステムによる高温のDNAのインビトロ増幅を含めた当該分野で公知の他のポリヌクレオチド重合反応も使用することもできる。ウォーカー(Walker)ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U. S. A., 第89巻：第392頁〜第396頁(1992年)。リガーゼ反応もまた使用できる。ベックマン・ケイ(Beckmann, K)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.), 第38巻：第457頁〜第458頁。

一つの具体例において、本装置には、増幅したポリヌクレオチドを検出する手段を包含することもできる。本装置は、細胞中または溶解中のポリヌクレオチド

る。図1および図2中に模式的に示すごとく、装置10には、注入ポート16、メソスケールのフロー・チャンネル20、およびPCRチャンパー22を微細加工したシリコン基材14を包含させることができる。重合反応に必要なとされるポリヌクレオチド試料と試薬は、フロー・チャンネル20のいずれかの端部に加工された注入ポート16を通り、フロー・チャンネル20および反応チャンパー22を通過して添加され、生成物は(もし必要ならば)取り出される。基材14はガラスまたはプラスチックのカバースリップ12により覆われる。分析の間、装置10は図3Aに模式的に示された器具50のごとき器具と組み合わせる用いることができる。器具50はフロー・ライン56をその中に備えており、装置10を保持するための、そして、例えば、装置10上のポート16のようなポートと対合させるための、収容部位58を含む。器具50中のポンプ52は、試料および/または試薬を注入ポート16を介し本器具内のフロー・ライン56から反応チャンパー22まで輸送するのに用いられる。

器具50には、例えば、電気的加熱要素および/または冷却コイルのような、PCRチャンパー中の温度を制御するための加熱/冷却要素57を包含させることができる。電気的加熱要素を、別法として、反応チャンパー22の下方の器具中のマッピング電気接点に対して対合する電線用の接点と共に、基材10中に組み込むこともできる。別法として、図3Bに示すごとく、本器具には、装置10中の反応チャンパーの上方に配置された、レーザーまたは他の電磁気エネルギーのごとき加熱手段53を包含させることができる。別法として、レーザーは反応チャンパーの下方の器具内に設けることもできる。器具中のマイクロプロセッサはハイブリッド制御に適した温度、例えば94℃でアニーリングおよび重合に適した温度、例えば65℃の間のPCRチャンパー中で温度サイクルを開始するための加熱要素を制御するために用いることができる。マイクロプロセッサが反応チャンパー中の温度サイクルを検出し維持するために、器具と電気的に接触させて、基材中に熱電対を設けることもできる。小型の熱電対によるヒートポンプ(マテリアルズ・エレクトロニクス・プロダクツ・コーポレーション(Materials Electric Products Corporation)、トレトン(Treton)、ニュージャージー(New

Jersey)のごとき冷却装置もまた反応チャンバーの温度を調節するために器具中に含めることができる。もう一つの具体例において、図3B中に示される器具50中で、PCRサイクルのため要求される温度に試料を連続的に加熱し冷却するために、ガラスカバー12を通しての反応チャンバーに向けた時間を定めたレーザーパルスにより反応チャンバーの温度を制御することができる。シリコンの温度特性により、迅速な加熱および冷却のサイクルが可能となる。

分析装置は、当該装置内のメソスケール・チャンネルの内容物を見るための器具と組み合わせることもできる。一つの具体例における本器具は、装置内のメソスケールのチャンネルの内容物を見るための顕微鏡よりなるものであってよい。もう一つの具体例において、図17および18に模式的に示した器具60内で図示したごとく、カメラを器具内に含めることもできる。器具60には、ハウジング62、結像のためのスクリーン、およびチップを本器具中に挿入するためのスロット66を設ける。図17の断面図に示されるように、器具60には、ビデオカメラ68、光学系70、および、装置10を保持し、かつ装置10の配置と角度を手動で調節できるようにするための傾斜機構装置72をも含ませることができる。光学系70には、光源だけでなくチャンネルの内容物を拡大するためのレンズ系を含ませることもできる。ビデオカメラ68およびスクリーン64により、重合したポリヌクレオチドの存在によって引き起こされる、流れの特性または色の変化のごとき試料液体の特性の変化が視覚的に監視され、また、所望により該器具を用いて記録することが可能となる。

もう一つの具体例において、図4、5および6Aに模式的に示すごとく、メソスケールのPCRチャンパーには、複数のセクション、例えば、フロー・チャンネル20Bにより連絡された2個のセクション22Aとセクション22Bを連続加工することができる。この具体例において、セクション22Aをハイブリッド状態に達した温度に加熱し、セクション22Bを、アニーリングおよび重合に達した温度に加熱する。分析の間、装置10は器具50の中に置くことができる(図6A)。器具50には、反応チャンパー・セクションの温度を制御するための手段57を設ける。別荘として、これらのセクションを加熱するためにレーザーを使

用することもできる。反応チャンパー中のこれらのセクションの温度を監視するために基材中に熱電対を含め、その出力をマイクロプロセッサの助けを借りて温度の入力を制御するために用いることができる。操作にあたり、器具中のポンプ52は、ポリヌクレオチド試料を輸送し、また必要とされるPCR試薬を注入ポート16Aを通しセクション22Aまで輸送するために用いられる。器具中のマイクロプロセッサによっても制御できるポンプ52は、次いで、連続的なポリメラーゼ反応を実施するために試料をチャンネル20Bを通してセクション22Aとセクション22Bの間を連続的に循環させるために使用され、ここにポート16Bはベントとして供される。反応の完了時には、器具50中のポンプ52は生成物を回収するため、器具中において試料をポート16Bとライン56を通してポート59に輸送するために使用することができる。もちろん、3番またはそれ以上のチャンパーを用いることもでき、その各々は個々の反応を行うのに適した温度に維持される。

もう一つの具体例において、図4、5および6B中に示される装置10では、二本鎖DNAのハイブリッド状態に達した温度、例えば、94℃にセクション22Aを加熱するために加熱要素が用いられ、一方セクション22Bとチャンネル20Bは、セクション22A、セクション22Bと連絡しているが、加熱された試料の、セクション22Aからセクション22Bまでの輸送の際に、試料の温度が、試料がさらなる循環のためにセクション22Aに戻る前に、その温度がアニーリングおよび重合に必要なとされる温度まで下がるように熱を効率的に放散させることができるように、セクション22Aから一定の間隔をおいて配置される。これは、シリコンが比較的高い熱伝導率を有し、液体試料と基材との界面の面積が非常に高いことにより容易に達成することができる。この具体例において、器具50内のマイクロプロセッサは、セクション22Aと22Bの間の試料の流れのサイクルを調節するポンプ52を制御するために用いることができる。それゆえ、動的熱平衡によってチャンパー間の流れに沿った温度勾配がつくられ、双方において単一の加熱源を用いることにより適切な温度が達成される。他の設計も可能である。例えば、アニーリングおよび重合反応は、異なる最適温度

に設定した一箇のPCRチャンパー中の異なるセクションで行なうことができる。

ポリメラーゼ反応は、 $T_{90.9}$ (T_{90.9}) ポリメラーゼのごときいずれの耐熱性ポリヌクレオチド・ポリメラーゼを用いても実施することができる。クック(T_{90.9}) ポリメラーゼのごとき試薬は試料に添加され、次いで、メソスケールの反応チャンパーへの注入ポートを通して輸送されるか、あるいは試薬は試料とは別に、別々の注入ポートを通し反応チャンパー中に輸送される。

本装置の容量は非常に小さく、それゆえ一回の分析に必要な試料液体の量は非常に少ない。例えば、その表面に幅10ミクロン×深さ10ミクロン×長さ1cm(10ミクロン)の500の溝が彫刻している1cm×1cmのシリコンの基材において、各溝の体積は 10^{-12} μLであって、500の溝の全体積は0.5μLである。メソスケールのフロー・システムの体積が小さいことにより、試料液体の非常に小さい量(＜5μL)で分析がなされる。本装置のメソスケールのフロー・システムはマイクロリットルの体積にて熟成加工されるかまたは、別荘としてナノリッターの体積もしくはそれより少ない体積にて熟成加工され、このことにより一回の分析に必要なとされる試料および/または試薬の液体の量を有利に限定する。

本発明の装置は生物学的な試料においてポリヌクレオチドの迅速な増幅のために用いられるメソスケールのポリヌクレオチド重合反応チャンパーを供給する。本装置は増幅したポリヌクレオチド生成物を検出するための基材中あるいは器具中にある手段も含む。装置中における増幅したポリヌクレオチド生成物の存在はメソスケールのフロー・システム中の反応チャンパーに入るおよび/または存在する試料液体の圧力もしくは電気伝導率を監視することを含めた多くの方法のいずれによっても検出可能である。増幅されたポリヌクレオチド生成物の存在は、ラベルされたオリゴヌクレオチドまたは抗体プローブのごときラベルされたプローブによる結合アッセイ、もしくは電気伝導率によっても検出できる。

一つの具体例において、増幅したポリヌクレオチド生成物は基材中において反応チャンパーと液体で連絡したメソスケールのフロー・システム中に加工された

検出チャンパーを用いて検出可能である。検出チャンパーには増幅されたポリヌクレオチドと結合可能な結合部位を設ける。結合部位は、例えば、ポリヌクレオチドまたは抗体プローブからなるものとすることができる。検出チャンパーはJ. S. シリアルナンバリング(特許人明細書 No. UPA 001(8261/2))、メソスケール・ディテクション・ストラクチャーズ (Mesoscale Detection Structures) に開示されている方法により加工でき、その開示を引用により本明細書の一部分とみなす。本装置は分析中に得られるデータを検出し記録するマイクロプロセッサを含む器具と組み合わせることもできる。

一つの具体例において、メソスケールの検出チャンパーには、重合したポリヌクレオチド生成物の存在下において、検出可能なビーズの凝集を引き起こすために、重合したポリヌクレオチドに結合することのできる不活性粒子、例えば、ビーズあるいは他の粒子を設けることができる。粒子により誘導される凝集は、抗体のごとき結合部位の粒子への付着により促進できる。

重合したポリヌクレオチドに結合可能な抗体あるいは他の結合部位は、結合を誘導するために検出チャンパーに導入されるか、あるいは化学的もしくは吸収によるか、いずれかにより検出領域の表面に配置されるか、あるいは別荘として、検出領域の不活性粒子の表面に配置されるか、ポリヌクレオチドが陽性であるかどうかの試験が行える。シリカ質の表面の化学的活性化技術は、特にクロマトグラフィーの方面においてよく発達している。(例えば、ソリッド・フェーズ・バイオケミストリー(Solid Phase Biochemistry)、デブリュー・エイチ・スコーテン(H. E. Scouten)編、ジョン・ウィリー(John Wiley)、ニューヨーク、第335頁〜第397頁(1983年)におけるハラー(Baller)の文獻;およびマンデニウス(Mandenius)らの、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第170巻:第68頁〜第72頁(1988年)参照)。一つの具体例において、結合部位は抗体からなり、当該分野において公知のイムノアッセイの技術を検出領域において実施することができる。(ボルトン(Bolton)らの、ハンドブック・オブ・エクスperimentalイムノロジー(Handbook of Experimental Immunology)、ピア・ディ・エム(Pier, D. E)編、ブラックウェル・サイエンティ

フマック・パブリケーションズ(Blackwell Scientific Publications)、オックスフォード(Oxford)、1986年、第1巻、第26章をイムノアッセイの一般的議論のために参照された)。

蛍光分子または蛍光ビーズのごとき光学的に検出できる標識を結合部位に結合させて、重合されたポリヌクレオチドの検出を向上させることもできる。別法として、蛍光標識抗体のごとき二次標識物質を、検出システムを通してデリバリーして、検出領域中の結合したポリヌクレオチド/結合部位に結合させて、分析物の存在の指標となる光学的に検出可能な部分を含有する「サンドウィッチ」を形成させることもできる。検出領域における増幅されたポリヌクレオチドの結合は、検出領域にわたり配された透明窓を通して、例えば、光学的に、複屈折または機械により検出することができる。一の具体例において、増幅されたポリヌクレオチドの生成は、臭化エチジウムのごとき染料の添加により検出することができ、これは二重鎖ポリヌクレオチドへの結合に際し蛍光の向上を示す(ヒグチ(Biguchi)ら、バイオテクノロジー(Biotechnology)、第10巻:第413頁(1992年))。

また、増幅されたポリヌクレオチドの1方の鎖に結合しうる標識した相補的ポリヌクレオチド鎖、例えば、ビーズ上に固定化させた標識ポリヌクレオチドを検出領域に配してもよく、ビーズ選別の手段により、重合されたポリヌクレオチド生成物を検出できる。当分野で公知のポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーション技術を利用することができる(マニアティス(Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス(Cold Spring Harbor Press)、1989年); ベナー(Vener)ら、アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.)、第198巻:第308〜第311頁(1991年))。ポリヌクレオチドプローブを、例えば、サブミクロンのラテックス粒子に、結合させることもできる(ウルフ(Wolf)ら、ヌクレック・アシズ・リサーチ(Nucleic Acids Research)、第15巻:第2911〜第2926頁(1987

ネルは、一連の狭い流動チャンネルを供するの各々の分岐点で、直径が小さくなるシリコン基板上に加工してもよい。図7は、チャンネル20を介してポート16に連絡した流動チャンネルのフラクタル分岐システム40、ならびに、部分2-2Aおよび2-2BよりなるPCR反応チャンバーを加工した基片14の模式的な平面図である。試料中の増幅されたポリヌクレオチド生成物の存在は、該フラクタル中における流動特性に影響するであろう。この具体例における該チャンネル40は、材料に配されており、該フラクタルの中心に向かって連続して狭くなる直径を有する。このフラクタルを通る流動は、重合された生成物の存在により引き起こされる流体粘度の変化に敏感である。別法として、図13に図示するごとく、さらに複雑なフラクタル流動システムを利用することもできる。図13は、一対のフラクタル分岐流動チャンネル40Aおよび40Bを図示する。該フラクタル流動チャンネル40Aは、該フラクタルの中心に向かって連続して狭くなる流動チャンネルで構成されており、その結果、流動制限に対する感受性が向上している。

該フラクタル領域中の流動制限は、該検出領域にわたる透明カバーを通して、例えば、光学的に、検出することができる。別法として、1またはそれを超える圧力センサーを利用して、該フラクタル流路の中またはそれを越える増幅されたポリヌクレオチドの存在により引き起こる流体特性の変化に起因する圧力変化を検出してもよい。また、ポリヌクレオチド生成上の導電性の変化も、該流動領域に結合する電気的導電センサーを通して容易に検出できる。例えば、流入ポート16Aから流出ポート16Bへの流動が遮断する該フラクタル領域40の目標りは、通常の導電プローブ17により検出できる。該プローブの出力は、外部流動チャンネルにおける水性流体の存在または不在の指標である。標識した抗体またはポリヌクレオチドプローブのごとき結合部位は、フラクタル領域中に、例えば、固定化するか、あるいは、ビーズのごとき固相反応物の上に含有させてもよく、生成ポリヌクレオチドに結合して該フラクタル流路中の流動制限を誘起する。

一の具体例において、該メソスケール流動システムは、下流のポリヌクレオチ

ド)。

また、(出典明示して本明細書の一部とみなす)US S N(代理人ファイル番号U P A 002(8261/3))、アナリシス・ベースド・オン・フロー・レストリクション(Analysis Based on Flow Restriction)に開示されているように、該反応チャンバーで生成させた重合ポリヌクレオチドの存在により引き起こされる流動制限に敏感な検出領域を用いてポリヌクレオチド重合を検出することもできる。また、増幅されたポリヌクレオチドの存在は、該流動システムを出入りする流体試料の圧力または電気的導電性を検知することによっても検出することができる。該導電性は、例えば、該基材を通して伸び該装置と組み合わせて用いる器具の電気接触面と接触する電気接触面を用いて測定することができる。電気接触面は、公知の無勾配溶融により加工できる(ファンデメンタルズ・アンド・アプリケーションズ・オブ・ケミカル・センサーズ(Fundamentals and Applications of Chemical Sensors)、ディー・シュエツェル(D. Schuetzle)およびアール・ハメル(R. Hamerle)監、エイシーエス・シンポジウム・シリーズ・309(ACS Symposium Series 309、ワシントン、ディシー(Washington, DC)中のゼーメル(Zemel)ら、1986年、第2頁参照)。

該反応チャンバー中の増幅されたポリヌクレオチドは、該試料流体の圧力をモニタすることにより検出できる。例えば、図6Aに模式的に図示する、器具50に収容させた装置10においては、ポート16を通して該メソスケール流動システムを出入りする試料流体に連絡した圧力検出器54により、重合された生成物および生成した目標りの存在または流動制限により引き起こされる圧力の下降を検出することができよう。また、メソスケール圧力センサーを直接シリコン基板上に加工してもよい(アンゲル(Angell)ら、サイエンティフィック・アメリカン(Scientific American)、第248巻:第44〜第55頁(1983年))。流動制限に敏感で、例えば、連続して流動チャンネルを分岐させる形状の、「フラクタル(fractal)」形状で構成されているメソスケール流動システムを用いることにより、ポリヌクレオチド重合を検出できる。該フラクタル分岐チャン

ド分析の準備として、試料からの細胞を溶解するためのチャンバーを含有する。また、該装置は、異種細胞集団中の特定の細胞型を分離するために適用される領域を含有してもよい。該細胞分離領域は、該基材の構造上に固定化させた固定化結合部位を含有し、これはタンパク質のごとき特異的な細胞表面分子を介して標的細胞に選択的に可逆的に結合する。該試料中の他の細胞は下流へ通過し、排水溝または排出ポートを通して排出する。例えば、該溶液の流動で、流動を続けて該細胞を洗浄する。高流速および高圧では、該洗浄した細胞は表面から剥がれて、分離領域から放出され、下流の溶解手段へ移動され、該手段において、細胞内のRNAまたはDNA分子のPCR分析の前に該細胞が溶解される。

該細胞溶解手段は、典型的には、該細胞分離領域およびポリヌクレオチド重合反応チャンバーの間の流路に配されて、細胞内ポリヌクレオチドの分析の前に該細胞を溶解できる。図9に図示するように、該細胞溶解手段は、流動チャンネル20の表面から伸びる細胞膜を貫通する突起物90よりなるものとして構成することができる。該貫通する突起物90を通して流体流動を押し込むと細胞が破壊される。もう一つの具体例において、該細胞溶解は、単純に十分な流動圧の適用で細胞を溶解する、制限された断面直径の領域よりなっている。該細胞溶解手段は、メソスケール溶解チャンバーに挿入された鋭利なシリコンピースよりなっている。ポンプのごとき、該細胞を含有する試料を該細胞溶解手段へ押し込むための手段を含有する器具は、十分な流動圧の適用で細胞を溶解し、続いて流動システムを通して該試料を該反応チャンバーへデリバリーする。もう一つの具体例において、該細胞溶解手段は、細胞溶解剤を含有している。当分野で公知の細胞溶解剤を利用することができる。

該反応チャンバーに流体連絡した該基材中の離れた流入ポートから、列を該反応チャンバーに添加してもよい。シリコン基板上の該流動チャンネルに露出加工されたフィルターを用いて、ポリヌクレオチド分析の前に細胞夾雑物を濾過することができる。一の具体例において、図14、15および16に示すように、装置10の該フィルク24は、チャンネル20に比して減少した直径のメソスケ

ール流動チャンネルよりなっている。操作において、試料はフィルター24を通過して試料流動チャンネル20Aから流動する。次いで、試料溶液がフィルター24から引出されて、チャンネル20Bを通過して流動する。フィルター24が、0~1ないし20 μ mの単位の深さおよび幅で微細加工される一方、流動チャンネル20AおよびBは、約500 μ mの単位の最大深さおよび幅を有する。また、図8に図示するように、流動チャンネル20の表面は、PCR分析チャンパーから上流の、大きさにより細胞を分離するための細胞ふるい(cell sieve)を構成する突出物80も含有してもよい。典型的には、低圧下にて、細胞試料を流動チャンネルを通して流動させると、突出物80の間を通過するのに十分に小さな細胞のみが下流の機能要素(functional element)にたどり着く。続いて、これらの細胞は、細胞溶解領域を通り、次いで、分析用のPCR反応チャンパーにデリバリーされる。

もう一つの具体例において、常磁性または物磁性のビーズを該メソスケール流動システム内に配して、例えば、器具のような、外部的な磁場により該流動システムに沿って動かすことができる。該ビーズを用いて該装置中の機能要素間には試料を移動させることができるか、あるいは、試料、試薬または反応混合物を置き換えることもできる。一の具体例において、ポリヌクレオチドプローブを該磁性ビーズ上に固定化させて、該ビーズが該増幅させたポリヌクレオチドに結合できるようにしてもよい。ポリヌクレオチドプローブのコーティングよりなる磁性ビーズは、アッセイの終了時に、該流動システムを通過して該反応チャンパーに移動させて、該重合させたポリヌクレオチド生成物に結合させてもよい。次いで、結合した重合ポリヌクレオチドを該磁性ビーズ上に、該流動システムの検出チャンパーまたは検出チャンパー、あるいは収束ポートへ移動させてもよい。

図10に図示した本発明の一の具体例は、流路20Bで連結されたセクション22Aおよび22BよりなるメソスケールPCRチャンパーが微細加工された基材14よりなる装置10である。該PCRチップ10は、該チップを支持するための収容部位を含有する図6Aに示す器具50のごとき、器具と組み合わせて用

いる。該器具50は装置10中でポート16A、16B、16Cおよび16Dに連結した流路56を配する。また、該器具は、該ポート16A、16B、16Cおよび16Dを機械的に開閉するバルブも含有する。一の具体例において、該装置の流動システムを液圧的に偏したまま維持し、該器具中、または別法として、該装置中のバルブを利用して流体流動を向ける。該PCRチャンパーのセクション22Aおよび22Bを94℃および65℃に各々加熱し、PCRに必要な融解温度およびアニリング温度にする。前記で述べたごとく、反応チャンパーセクションは、該セクションの下に基剤中に組み込まれた電気加熱部的手段により加熱してもよく、該セクションに該器具の中の電気加熱部と連結することができる。別法として、光学的レーザーを用いて、支持体にわたり配されているガラスカバーを通して、該反応チャンパー部分を加熱してもよい。加熱センサーを、該器具の電気加熱部中の該基材中に配してもよい。該器具中のマイクロプロセッサを用いて、該反応チャンパーセクションの温度、ならびに該流動システム中の流体の流動を制御することができる。

最初に、該チャンネルおよび検出領域を偏したチャンパーの操作において、ポート16Aおよび16Cを開ける一方で16Bおよび16Dを閉める。該器具中のポンプ52は、該試料液体、ならびに、所望により、タック・ポリメラーゼ、プライマーおよびヌクレオシド三リン酸のごときPCRに要する試薬を、ポート16Aを介して、フィルター24を通過して反応チャンパーセクション22Aにデリバリーする。次いで、ポート16Aを閉め、16Bを開け、該器具中の該ポンプ52を用いて、ポリヌクレオチド脱ハイブリダイゼーション(dehybridization)を促すセクション22Aと、アニリングおよび重合反応を促すセクション22Bとの間に流動チャンネル20Bを通過して流体流動を相互循環させる。ポート16Cを用いれば、該システムを排出でき、また、所望により、タック・ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、プライマーおよび他の試薬等をデリバリーすることもできる。例えば、30ないし35循環後の該ポリメラーゼ誘導反応が完了したら、ポート16Cを閉め、ポート16Dを開けて、該器具中のポンプを作

動させて該反応生成物をPCR反応チャンパーセクション22Aおよび22Bから、例えば、ビーズ92に固定化させた増幅されたセンスおよび/またはアンチセンス鎖に相補的なポリヌクレオチドを含有する検出チャンパー22Cにデリバリーする。重合生成物は、例えば、該検出領域にわたり配した透明カバーを通して、ビーズ92の試薬を透過することにより視覚的に検出する。

もう一つの具体例を図11に図示する。この装置の機能、構造および操作は、単一のPCR反応チャンパー22Aよりなることを除き、図10に示したものと同一である。該装置は、図3Aに示した器具50のごとき器具と組み合わせて用いる。該装置は、融解に要する温度およびアニリングまたは重合に要する温度のいずれかに、反応チャンパー22Aを加熱および冷却するための手段を含有する。

操作においては、該器具を用いて、PCRに要するポリメラーゼおよび他の試薬を流入ポートを通して反応チャンパー22Aにデリバリーする。次いで、該器具に連結したバルブを用いてポート16Aおよび16Dを閉める一方、16Bおよび16Cを開けたまま維持する。次いで、該器具中の加熱要素を利用して、脱ハイブリダイゼーションに適當な温度と、アニリングおよび重合に適當な温度との間に該反応チャンパーを熱循環させる。該PCR反応循環を完了したら、ポート16Cを閉め、ポート16Dを開けて該試料を、例えば、ビーズ92上に固定化させた、ポリヌクレオチドプローブを含有する該検出チャンパー22Bにデリバリーする。該ポリヌクレオチドの陽性アッセイは、該検出チャンパー中のポリヌクレオチドプローブの試薬によって示される。

本発明は、以下の限定されない実施例からさらに理解されよう。

実施例1

図11に模式的に図示した装置の中でポリメラーゼ反応を行う。細胞中のポリヌクレオチドを検出するためにPCR分析を行うには、試料細胞溶解物をタック・ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、ポリヌクレオチドプライマーおよび他のPCRに要する試薬の溶液に添加する。該細胞試料溶解物を流入ポート

16Aを通して該器具を介して、PCR反応チャンパー22Aにデリバリーする。該器具中に含有されるバルブ手段によりポート16Aおよび16Dを閉じる一方、ポート16Bおよび16Cを開ける。該器具中のマイクロプロセッサおよび温度制御要素を用いて、反応チャンパー22Aにて、ポリヌクレオチド脱ハイブリダイゼーションのための94℃、およびポリメラーゼ反応のための65℃の間に温度循環させる。該ポリメラーゼ反応が完了した後に、ポート16Cを閉め、16Dを開けて、ポート16Bに連結した該器具中のポンプを用いて、該PCRチャンパー22Aからの試料を流動チャンネル20Bを通過して該検出チャンパー22Bにデリバリーする。ビーズ92を含有する検出チャンパー22Bは、増幅させたポリヌクレオチドに結合できる表面に固定化した相補的なポリヌクレオチドよりなる。増幅させたポリヌクレオチドおよび相補的なポリヌクレオチドの間のハイブリダイゼーション反応により引き起こされるビーズの凝集は、該検出領域22Bにわたり配された窓を通して観察し、増幅させたポリヌクレオチド生成物の存在テストを提供する。

実施例2

図12は、生物流体試料混合物中の細胞至菌団から該酸を分離するのに用い、次いで、特定のヌクレオチド配列のアッセイを行うために用いる基材14を含有する装置10を模式的に図示する。装置10上に微細加工されているのは、細胞分離チャンパー22A、細胞溶解チャンパー22B、フィルター領域24、セクション22Cおよび22DよりなるPCR反応チャンパー、ならびにフラクタル検出領域40を含有するメソスケール流路20である。また、該メソスケール流動システムには、流体投入/排出ポート16A、16B、16Cおよび16Dが配されている。該装置は、図6Aに示す器具50のごとき器具と組み合わせて用いる。

最初に、該器具中のバルブを用いてポート16Cおよび16Dを閉める一方、ポート16Aおよび16Bを開ける。細胞混合物を含有する試料を、該器具中のポンプ52により試料インレット口16Aに向け、メソスケール流路20を通し

は請求の範囲に定義されるごとく、本発明の一部分と考えられよう。

で分離チャンバー22Aに流動させる。チャンバー22Aは、該チャンバーの壁に固定化した結合部位を含有し、これは試料中の所望の細胞型上の表面分子に選択的に結合する。残りの細胞成分は、ポート16Bを介して基材の外に排出される。チャンバー22A中の所望の細胞集団に結合した後も緩衝液を流動させて洗浄し、該細胞集団の単離を確認する。次に、ポート16Bを閉じ16Cを開ける。次いで、流動を十分に増加させて固定化している細胞を剥ぎとる。流動を停めて、チャンバー22B中の膜を貫通する突出物90を通して細胞を押し込み、細胞を破壊して細胞内物質を放出させる。

フィルター24の後に試料を流動させ続け、大きな細胞膜成分および他の突出物を、流動チャンネル20BによりPCRチャンバーセクション22Dに連絡したメソスケールPCRチャンバーセクション22Cに運搬する。次に、PCRアッセイに要するタック・ポリメラーゼ、プライマーおよび他の試薬を、該器具中の連絡したポートおよび流路からポート16Cを通してセクション22Dに添加すると、分離した細胞集団からの細胞内可溶性成分と該PCR試薬とが混合する。ポート16Aを閉じるとともに、ポート16Bを介して連絡した該器具中のポンプを用いて、PCR試料および試薬を各々94℃および65℃に設定したセクション22Cおよび22Dの間に流動チャンネル20Bを通して循環させ、複数のポリヌクレオチド融解および重合の循環を行い、生成物ポリヌクレオチドを増幅させる。次に、該器具中のバルブを用いてポート16Cを閉じ、ポート16Dを開ける。次いで、ポート16Bに連絡した該器具中のポンプを用いて、細胞集団から単離した該増幅させたポリヌクレオチドを、流路40の一連のフラクタル分岐よりなる検出領域に向ける。該フラクタル領域40における流動制御は、増幅させたポリヌクレオチド生成物の存在の陽性指標として配され、該検出領域にわたり配されたガラスカバーを通して光学的に検出される。

前記の記載が図示の方法により記載されたもので、本発明が、本明細書中に記載した構造および方法の意図の範囲内の他の形態をとることは理解されよう。当業者なら変形および修飾を思い付くであろうし、かかる全ての変形および修飾

FIG.1

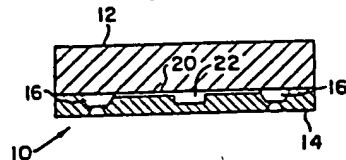


FIG.2

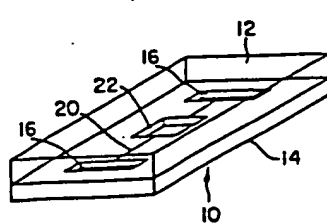


FIG.3A

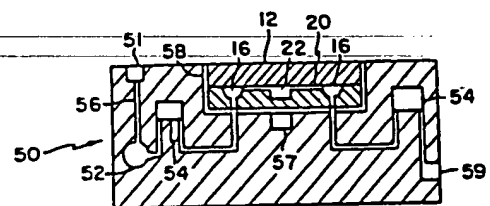


FIG.3B

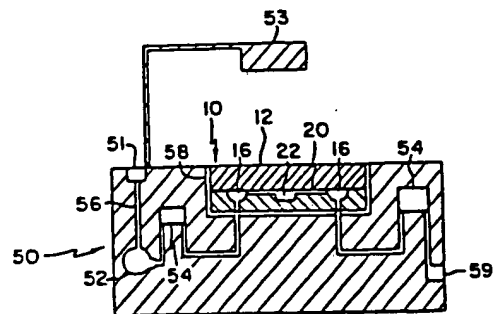


FIG.4

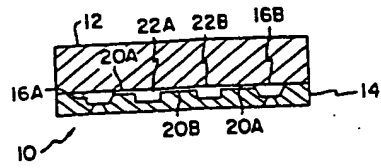


FIG.5

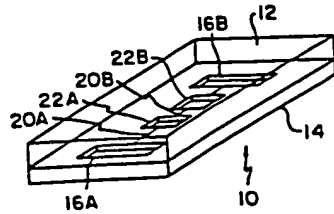


FIG.6A

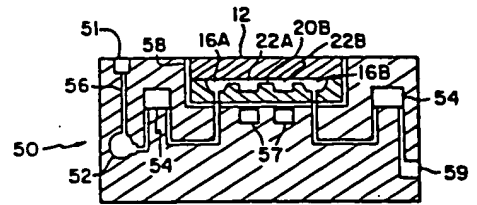


FIG.6B

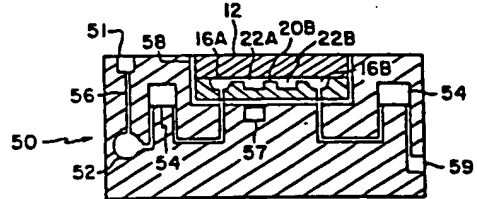


FIG.7

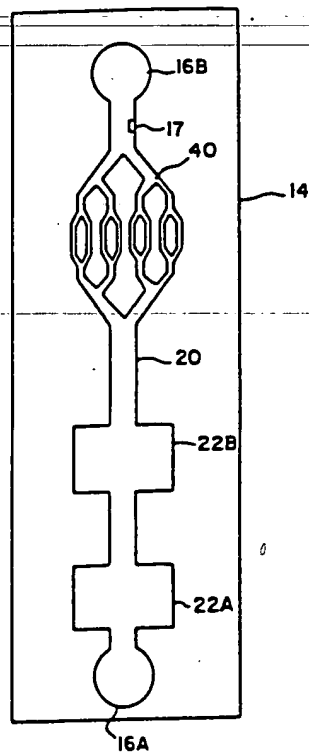


FIG.8

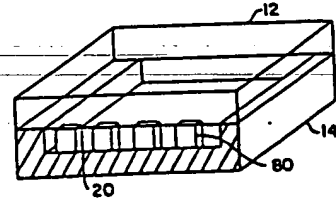


FIG.9

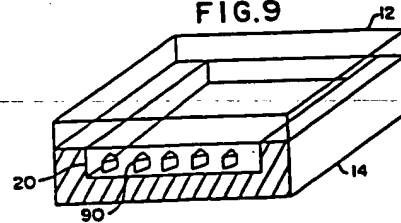


FIG. 12

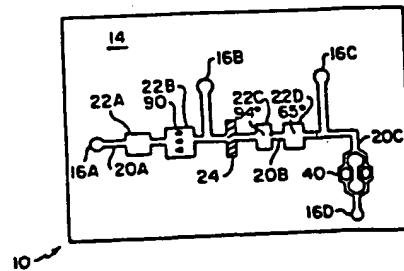


FIG.10

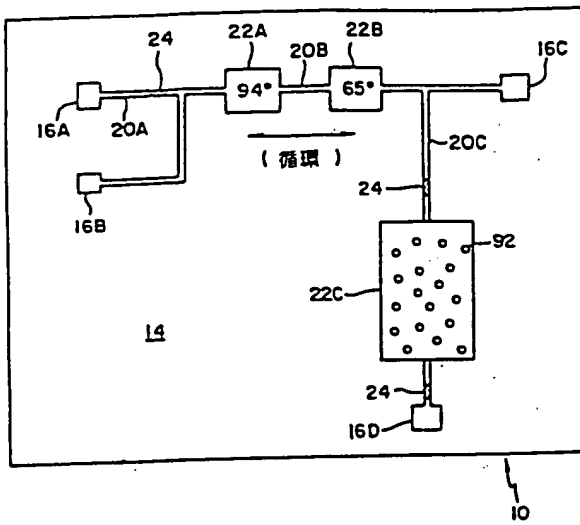


FIG.11

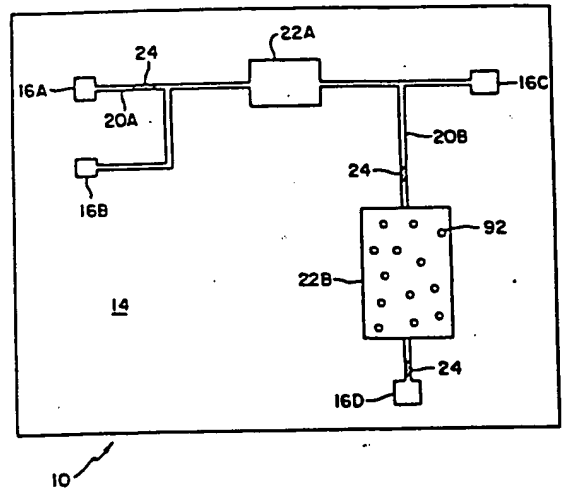


FIG.13

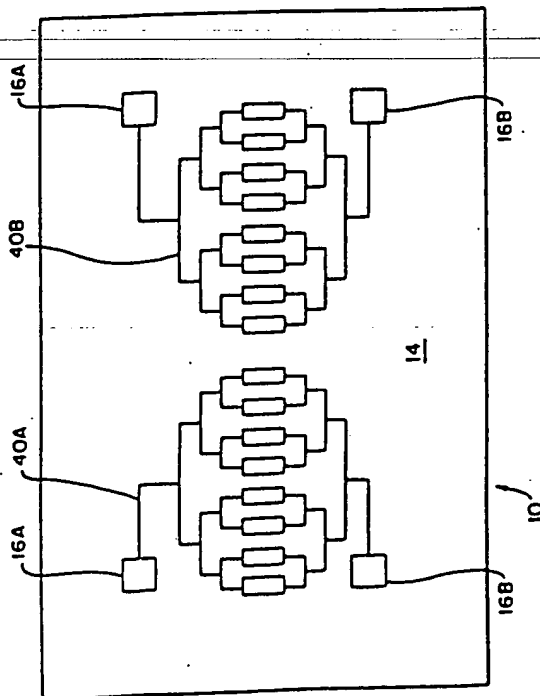


FIG.14

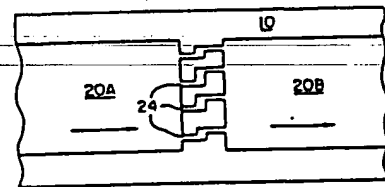


FIG.15

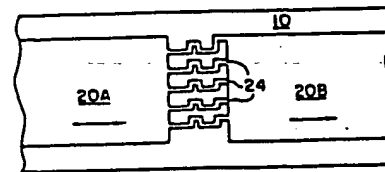


FIG.16

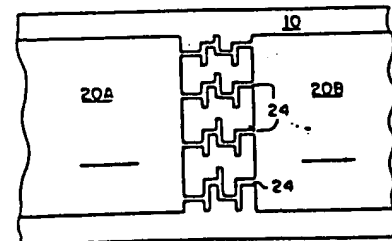


FIG.18

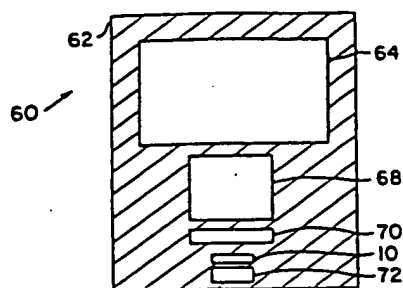
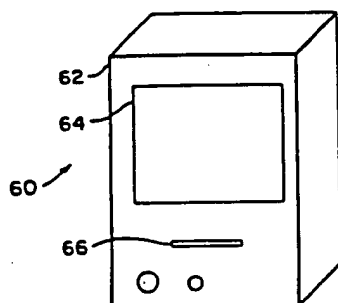


FIG.17



1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC:			
Int.Cl. 5	B01L7/00;	B01L3/00;	C1201/68;
B01L19/00			
2. PRIOR ART			
3. SUMMARY OF THE INVENTION			
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS			
5. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
6. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Reference	Character of Document	Relevance to Claim No. 1
A	FR, A, 2 650 657 (S.C.R.A.S. SA) 8 February 1991	see page 5, line 26 - line 34 see page 6, line 13 - line 17; figure 1C see page 7, line 9 - line 28	1-3, 25-27, 33-36
A	WO, A, 9 116 966 (PHARMACIA BIOSENSORS AB) 14 November 1991	see page 2, line 18 - line 26 see page 4, line 26 - line 32 see page 10, line 1 - line 8; figure 1	1
A	EP, A, 0 402 995 (EASTMAN KODAK) 19 December 1990	see column 4, line 13 - line 55; figures 3-8 see column 5, line 16 - line 33 see column 7, line 4 - line 8	1
7. CLAIMS			
8. SUMMARY OF THE INVENTION			
9. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS			
10. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
11. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
12. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
13. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
14. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
15. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
16. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
17. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
18. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
19. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
20. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
21. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
22. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
23. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
24. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
25. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
26. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
27. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
28. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
29. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
30. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
31. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
32. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
33. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
34. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
35. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
36. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
37. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
38. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
39. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
40. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
41. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
42. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
43. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
44. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
45. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
46. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
47. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
48. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
49. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
50. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
51. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
52. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
53. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
54. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
55. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
56. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
57. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
58. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
59. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
60. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
61. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
62. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
63. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
64. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
65. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
66. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
67. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
68. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
69. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
70. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
71. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
72. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
73. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
74. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
75. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
76. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
77. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
78. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
79. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
80. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
81. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
82. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
83. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
84. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
85. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
86. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
87. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
88. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
89. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
90. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
91. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
92. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
93. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
94. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
95. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
96. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
97. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
98. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
99. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			
100. BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION			

This report was prepared by the Patent Office of the European Patent Office (EPO) on the basis of the information provided by the applicant. The applicant is responsible for the accuracy of the information provided. The Patent Office is not responsible for the accuracy of the information provided. 03/09/93

Patent Number	Publication Date	Patent Number	Publication Date
FR-A-2650657	08-02-91	AL-A-6014890	07-02-91
		BE-A-1004524	08-12-92
		CN-A-681431	31-03-93
		DE-A-4024714	07-02-91
		GB-A-2238005	22-05-91
		JP-A-3083572	09-04-91
		LU-A-87782	11-12-90
		RU-A-9001772	01-03-91
		US-A-5176203	05-01-93
WO-A-9116966	14-11-91	EP-A-0527905	24-02-93
		SE-A-9001699	11-11-91
EP-A-0402995	19-12-90	CA-A-2016981	12-12-90
		CA-A-2016982	12-12-90
		EP-A-0402994	19-12-90
		JP-A-3019700	28-01-91
		JP-A-3089939	15-04-91
		US-A-5089233	18-02-92

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 877, 662
(32) 優先日 1992年5月1日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 877, 701
(32) 優先日 1992年5月1日
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 877, 702
(32) 優先日 1992年5月1日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP